

J

008216118

WPI Acc No: 1990-103119/199014

Arginine deiminase gene - where DNA contains base sequence that codes aminoacid sequence of arginine deiminase composing polypeptide

Patent Assignee: AGENCY OF IND SCI & TECHNOLOGY (AGEN)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2053490	A	19900222	JP 88202759	A	19880816	199014 B
JP 93006998	B	19930127	JP 88202759	A	19880816	199307

Priority Applications (No Type Date): JP 88202759 A 19880816

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2053490	A		18		
JP 93006998	B		16	C12N-015/55	Based on patent JP 2053490

Abstract (Basic): JP 2053490 A

DNA contains base sequence that codes aminoacid sequence of arginine deiminase composing polypeptide. Vector which retains DNA above is also claimed. Transformant retains base sequence contg. DNA, where the base sequence codes aminoacid sequence of polypeptide which composes foreign arginine deiminase to host. Arginine deiminase has polypeptide as compsn., where the polypeptide is formulated as specified from N-terminal side (A shows aminoacid residue or H atom, B shows aminoacid residue or -OH). Transformant is cultured to express genetic information of the DNA; from the culture, arginine deiminase composing polypeptide is collected.

USE/ADVANTAGE - Arginine deiminase coding DNA and the DNA retaining transformant are used for prepn. of arginine deiminase by culturing the transformant. A large amt. of the enzyme useful as tumour cell static can be offered.

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/55

International Patent Class (Additional): C12N-001/20; C12N-001/21;

C12N-009/80; C12N-015/55; C12R-001-01

⑫ 公開特許公報(A) 平2-53490

⑤Int. Cl.⁹ 識別記号 庁内整理番号 ⑬公開 平成2年(1990)2月22日
 C 12 N 15/55 ZNA G 8515-4B
 1/20 Z 7823-4B
 9/80
 //(C 12 N 1/20
 C 12 R 1:19)
 8717-4B C 12 N 15/00 A
 審査請求 有 請求項の数 21 (全18頁)

⑭発明の名称 アルギニン・デイミナーゼ遺伝子

⑰特 願 昭63-202759

⑱出 願 昭63(1988)8月16日

⑲発明者 芳 陵 一 生 静岡県田方郡大仁町三福707-1
 ⑲発明者 溝 口 順 三 静岡県田方郡大仁町御門357-8
 ⑲発明者 佐 藤 裕 静岡県田方郡函南町柏谷1012-17
 ⑲出願人 工業技術院長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

明 細 書

1. 発明の名称

アルギニン・デイミナーゼ遺伝子

2. 特許請求の範囲

(1) アルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNA。

(2) アルギニン・デイミナーゼが下記の理化学的性状を有するものである特許請求の範囲第1項記載のDNA、

(a) 作用；L-アルギニンと水からL-シトルリンとアンモニアを生成する酵素反応を触媒する、

(b) 基質特異性；L-アルギニンに基質特異性を有する、

(c) 至適pH；7.0～7.5、

(d) pH安定性；5.0～10.0。

(3) アルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列が、N末端側より第1図（図中、Aはアミノ酸残基または水素原子を示し

、Bはアミノ酸残基または-OHを示す）で表されるものである特許請求の範囲第1項記載のDNA。

(4) 塩基配列が、5'末端側より第2図（図中、***はTGAまたはTCGを示す）で表されるものである特許請求の範囲第1項記載のDNA。

(5) アルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを保持することを特徴とするベクター。

(6) アルギニン・デイミナーゼが下記の理化学的性状を有するものである特許請求の範囲第5項記載のベクター、

(a) 作用；L-アルギニンと水からL-シトルリンとアンモニアを生成する酵素反応を触媒する、

(b) 基質特異性；L-アルギニンに基質特異性を有する、

(c) 至適pH；7.0～7.5、

(d) pH安定性；5.0～10.0。

(7) アルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列が、N末端側より第1図

(図中、A はアミノ酸残基または水素原子を示し、B はアミノ酸残基または-OHを示す) で表されるものである特許請求の範囲第5項記載のベクター。

(8) 塩基配列が、5' 末端側より第2図(図中、*** はTGAまたはTGGを示す) で表されるものである特許請求の範囲第5項記載のベクター。

(9) ベクターが、プラスミドである特許請求の範囲第5項記載のベクター。

(10) ベクターが、プラスミドpCTGIP1である特許請求の範囲第5項記載のベクター。

(11) 宿主にとって外来性であるアルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを保持することを特徴とする形質転換体。

(12) アルギニン・デイミナーゼが下記の理化学的性状を有するものである特許請求の範囲第11項記載の形質転換体、

(a) 作用; L-アルギニンと水からL-シトル

質転換体。

(17) 形質転換体が、エシェリヒア・コリDH1-PUC118-TGIF、エシェリヒア・コリCAJ64-PUC118-TGIFおよびその突然変異体よりなる群から選ばれたものである特許請求の範囲第11項記載の形質転換体。

(18) N末端側より第1図(図中、A はアミノ酸残基または水素原子を示し、B はアミノ酸残基または-OHを示す) で表されるポリペプチドを構成成分とするアルギニン・デイミナーゼ。

(19) 宿主にとって外来性であるアルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを保持した形質転換体を培養して、該DNAの遺伝情報を発現せしめ、該培養物からアルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドを採取することを特徴とするアルギニン・デイミナーゼの製造法。

(20) アルギニン・デイミナーゼが下記の理化学的性状を有するものである特許請求の範囲第19項記載の製造法、

リンとアンモニアを生成する酵素反応を触媒する、

(b) 基質特異性; L-アルギニンに基質特異性を有する、

(c) 至適pH; 7.0~7.5、

(d) pH安定性; 5.0~10.0。

(23) アルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列が、N末端側より第1図(図中、A はアミノ酸残基または水素原子を示し、B はアミノ酸残基または-OHを示す) で表されるものである特許請求の範囲第11項記載の形質転換体。

(24) 塩基配列が、5' 末端側より第2図(図中、*** はTGAまたはTGGを示す) で表されるものである特許請求の範囲第11項記載の形質転換体。

(25) 形質転換体が、エシェリヒア属に属する微生物である特許請求の範囲第11項記載の形質転換体。

(26) 形質転換体が、エシェリヒア・コリに属する微生物である特許請求の範囲第11項記載の形

(a) 作用; L-アルギニンと水からL-シトルリンとアンモニアを生成する酵素反応を触媒する、

(b) 基質特異性; L-アルギニンに基質特異性を有する、

(c) 至適pH; 7.0~7.5、

(d) pH安定性; 5.0~10.0。

(21) アルギニン・デイミナーゼがN末端側より第1図(図中、A はアミノ酸残基または水素原子を示し、B はアミノ酸残基または-OHを示す) で表されるポリペプチドを構成成分とするものである特許請求の範囲第19項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規なアルギニン・デイミナーゼ遺伝子および該遺伝子を用いたアルギニン・デイミナーゼの製造法に関する。

(従来の技術)

アルギニン・デイミナーゼ(酵素分類番号3.5.3.6)は、L-アルギニンと水からL-シ

トルリンとアンモニアを生成する酵素反応を触媒する酵素であり、動物、細菌、酵母類にその存在が知られている〔酵素ハンドブック、602頁、朝倉書店、1984年版、第1版第3刷〕。

これらの酵素のうち、精製されたと報告のあるものとしては、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・アルスリティディス (*Mycoplasma arthritidis*) が知られている〔カキモト、ティー、ら (Kakimoto, T. et al) フェブス レター (FEBS Lett.) VOL. 19, P 166-168, (1971); シムケ、アール、ティー、(Shinke, R. T.) メソッド オブ エンザイモロジー (Meth. Enzymol.) VOL. 17A, P 310-313, (1970); ウィクマン、ジェー、エル、アンド ファルニー、ディー、イー、(Weickman, J. L. & Fahrney, D. E.) ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.) VOL. 252, P 2615-2620, (1977)〕。

〔発明が解決しようとする問題点〕

腫瘍細胞増殖阻害剤として有用であるアルギニ

ン・デイミナーゼは、従来、アルギニン・デイミナーゼ生産菌により生産していたが、これらの製造法にはいくつかの問題点があった。すなわち、これらのアルギニン・デイミナーゼ生産菌は、アルギニン・デイミナーゼ生産性が低いこと；マイコプラズマに属するマイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・アルスリティディス (*Mycoplasma arthritidis*) から採取する場合は培養管理が煩雑であり、該酵素の大量生産における酵素源として用いるには難点があること；精製純化するのに極めて困難である等である。

アルギニン・デイミナーゼをコードする詳細な遺伝子の一次構造及び構成するタンパク質のアミノ酸配列の一次構造は未だ報告されておらず、上記問題点の具体的解決法が求められていた。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、先に動物腫瘍細胞 T R C - 2 9 R の培養中、顕著に増殖阻害を示す細胞株を見出し、その株について、種々研究を行った結果、その株に寄生したマイコプラズマ属に属する菌株マ

イコプラズマ・オラーレ (T G I F) (微工研函発第 1 9 7 0 号 (F E R M B P - 1 9 7 0)) が、アルギニン・デイミナーゼを産生することを見出した。

さらに、本発明者らは、上記問題点に関し鋭意研究の結果、アルギニン・デイミナーゼをコードする詳細な遺伝子 DNA の一次構造及び構成する該酵素のアミノ酸配列の一次構造を決定することに成功し、該 DNA を保持するベクターおよび形質転換体を得、該形質転換体を培養するアルギニン・デイミナーゼの製造法を確立し本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、以下に示す通りである。

アルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA、

アルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA を保持することを特徴とするベクター、

宿主にとって外来性であるアルギニン・デイミ

ナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA を保持することとを特徴とする形質転換体、

N 末端側より第 1 図〔図中、A はアミノ酸残基または水素原子を示し、B はアミノ酸残基または -OH を示す〕で表されるポリペプチドを構成成分とするアルギニン・デイミナーゼ、および

宿主にとって外来性であるアルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA を保持した形質転換体を培養して、該 DNA の遺伝情報を発現せしめ、該培養物からアルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドを採取することを特徴とするアルギニン・デイミナーゼの製造法。

本発明のアルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA は新規物であり、本発明においてアルギニン・デイミナーゼとは前述の通り L - アルギニンと水から L - シトルリンとアンモニアを生成する酵素反応を触媒するものを示すが、特に

例えば下記の理化学的性状を有するものを挙げる
ことができる。

- (a) 作用；L-アルギニンと水からL-シトルリンとアンモニアを生成する酵素反応を触媒する、
- (b) 基質特異性；L-アルギニンに基質特異性を有する、
- (c) 至適pH；7.0～7.5、
- (d) pH安定性；5.0～10.0。

また、アルギニン・デヒミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列が、N末端側より第1図（図中、Aはアミノ酸残基または水素原子を示し、Bはアミノ酸残基または-OHを示す）で表されるものであってもよい。該ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAとしては、図中のA、Bがアミノ酸残基を示す場合であり、A、Bを含め各アミノ酸に対応する一連のコドンのうちのいずれか1個のコドンからなるDNA（ポリデオキシリボ核酸）であればよい。アルギニン・デヒミナーゼを構成するポリペ

チドのアミノ酸配列をコードする塩基配列の代表例として、5'末端側より第2図（図中、***はTGAまたはTGGを示す）で表される塩基配列を有するDNAを挙げるができる。該塩基配列を含むDNAは、該塩基配列の5'末端側にアミノ酸をコードするコドンをも1個以上有したものでよく、好ましくはATGまたはシグナルペプチドに対応するコドンをも有したものを挙げるができる。3'末端側には、アミノ酸をコードするコドンをも1個以上有するかまたは翻訳終止コドンをも有するかのいずれでもよく、更に、その3'末端側にアミノ酸をコードするコドンをも1個以上有する場合には、このアミノ酸をコードするコドンの3'末端に翻訳終止コドンをも有することが好ましい。

これらの塩基配列は以下の如く決定した。即ち、予め、後記の精製法により精製したアルギニン・デヒミナーゼのN末端アミノ酸配列の一部を、液相プロテインシーケンサー（ベックマン社製：BECKMAN System 890ME）

で決定し、該アミノ酸配列を基にして合成されたプローブを作製する。次いでこのプローブを用い、後記の方法により作成された遺伝子ライブラリーとコロニーハイブリダイゼーションを行い、クローニングを行い、アルギニン・デヒミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを保持する形質転換体を得、該形質転換体より、アルギニン・デヒミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを採取する。その塩基配列は、Science 214 1205～1210 (1981年) に示されているジデオキシ法で解読し、またアルギニン・デヒミナーゼの全アミノ酸配列は、塩基配列より予測決定し、本発明のアルギニン・デヒミナーゼのDNA供と微生物より抽出されたアルギニン・デヒミナーゼのN末端部分アミノ酸配列と一致するものであることを確認した。

遺伝子ライブラリーの作成法としては、例えばDNAの供と微生物より採取した遺伝子DNAを制限酵素で切断し、該DNA断片をベクターに挿

入し、得られた組換えプラスミドで宿主微生物を形質転換しライブラリーを作製する方法が挙げられる。

分離精製された微生物DNAを切断する方法は、例えば、超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができるが、得られるDNA断片とベクターとの結合を容易ならしめるため、制限酵素、とりわけ特定ヌクレオチド配列に作用する、例えば、EcoRI, HindIII, BamHIなどのII型制限酵素が通している。

ベクターとしては、宿主微生物体内で自律的に増殖しうるファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが通している。

ファージとしては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) を宿主微生物とする場合には、 λ gt \cdot λ C, λ gt \cdot λ Bなどが使用できる。

また、プラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には pBR322, pBR325, pACYC184, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19, pUC118などが、パチルス・ズブチルス (

Bacillus subtilis) を宿主微生物とする場合には pUB110、pC194 などが使用でき、さらに、エシェリヒア・コリおよびサッカロマイセス・セレビシアなどの二種以上の宿主微生物体内で自律的に増殖可能なシャトルベクターを利用することもできる。このようなベクターを、先に述べたアルギニン・デヒミナーゼ遺伝子供与体である微生物 DNA の切断に使用した制限酵素と同じ制限酵素で切断して、ベクター断片を得ることが好ましい。

微生物 DNA 断片とベクター断片とを結合させる方法は、公知の DNA リガーゼを用いる方法であればよく、例えば、微生物 DNA 断片の接着末端とベクター断片の接着末端とのアニーリングの後、適当な DNA リガーゼの作用により微生物 DNA 断片とベクター断片との組換え DNA を作成する。必要ならば、アニーリングの後、宿主微生物に移入して、生体内の DNA リガーゼを利用し組換え DNA を作成することもできる。

宿主微生物としては、組換え DNA が安定かつ自律的に増殖可能で、且つ外来性 DNA の形質が

発現のできるものであればよく、例えば、宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合、エシェリヒア・コリ DH1、エシェリヒア・コリ HB101、エシェリヒア・コリ W3110、エシェリヒア・コリ C600、変異株としてエシェリヒア・コリ CAJ64 等が利用出来る。

宿主微生物に組換え DNA を移入する方法としては、例えば、宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換え DNA の移入を行い、またバチルス属に属する微生物の場合には、コンピテントセル法またはプロトプラスト法などを採用することができ、さらにマイクロインジェクション法を用いてもよい。

前述の DNA を採取するには以下の如く行う。即ち、DNA の供与微生物を、例えば、液体培地で約 1～3 日間通気攪拌培養し、得られる培養物を遠心分離して集菌し、次いでこれを溶菌させることによってアルギニン・デヒミナーゼ遺伝子を含有する溶菌物を調製する。溶菌方法としては、

例えばリゾチームや β -グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素による処理が施され、必要によりプロテアーゼなどの他の酵素やラウリル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤が併用され、さらに細胞壁の物理的破壊法である凍結融解やフレンチプレス処理を上述の溶菌法との組み合わせで行ってもよい。

このようにして得られた溶菌物から DNA を分離、精製するには、常法に従って、例えばフェノール抽出による除蛋白処理、プロテアーゼ処理、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈澱、遠心分離などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

DNA の供与微生物は、アルギニン・デヒミナーゼ産生能を有する微生物であればよく、例えば、マイコプラズマ属、シュードモナス属に属する生産菌等の群から適宜選ばれ、好ましくは、マイコプラズマ属に属するアルギニン・デヒミナーゼ生産菌が挙げられる。また、後記の分類学的性状を有する新規なマイコプラズマ・オラーレ (TCIF) (*Mycoplasma orale* (T

GIF)、微工研菌条寄第 1970 号 (FERMBP-1970) を利用することが好ましく、さらに、遺伝子組換え技術を駆使して、アルギニン・デヒミナーゼをコードする塩基配列を保持する形質転換体を DNA の供与微生物として利用してもよい。

前述のマイコプラズマ・オラーレ (TCIF) の分類学的性状は以下のとおりである。

1. 培地における生育状態

マイコプラズマ・オラーレ (TCIF) の液体培地 (培地組成: 培地 1 ℓ 中に PPL O プロス W/O (DIFCO 社製) 15 g, L-アルギニン塩酸塩 5 g, ウマ血清 200 ml, 酵母エキス 25 g, 酢酸ナトリウム 0.25 g, ペニシリン G カリウム 10 万単位, フェーノールレッド 5 mg を含有する) に於ける増殖は、種菌として 1×10^5 CFU/ml (CFU は集落形成単位 (Colony Forming Unit) を示す) 接種し、37℃で、静置培養した結果、誘導期に続いて対数増殖期に入り、培養開始 4～5 日後に菌数が最大になる定常期に至る。定常期

の期間は短く、培養によって異なり、且つほぼ数時間で、減数期に入る生育形態をとる。

II. 生理的諸条件

生育し得る pH: 6 ~ 8、

至適 pH: 7.4 ~ 7.6、

生育し得る温度: 30 ~ 37℃、

至適生育温度: 37℃。

III. 顕微鏡下における形態の特徴

寒天培地 (培地組成: 培地 1 ℓ 中に、バクトアガー (DIFCO社製) 10 g, PPL Oプロス W/O CV (DIFCO社製) 14.5 g, L-アルギニン塩酸塩 5 g, L-グルタミン 3 g, DNA (粗製) 20 mg, NAD 150 mg, グルコース 10 g, イーグルビタミン液 (×100) 10 ml, ウマ血清 200 ml, 酵母エキス 25 g を含有する) に於ける集落の大きさは、10 ~ 500 μm であり、中心部が濃く、周辺が薄く、いわゆる目玉焼状を呈する。染色は Di en es (ディエネス) 液 (メチレンブルー 2.5 g; アズール II 1.25 g; マルトース 10.0 g; Na₂CO₃ 0.25 g; 蒸留水 100 ml) を

用いて行った。染色液を寒天面に流し、1 ~ 2 分後に余分の液を捨て、顕微鏡観測した。集落の中心部は濃青色に周辺部は淡青色に染まって見えた。100 倍の顕微鏡倍率下では、周辺部は顆粒状に見えた。

IV. 抗体による発育阻害

ワラス (Wallace A. Clyde, JR) 著の文献 (ジャーナル オブ イムノロジー (J. Immunol.) VOL. 92, P. 958-965, (1964)) に従い、各マイコプラズマ種に対する抗血清を含む培地上の発育阻害よりマイコプラズマ・オラーレと同定された (東京大学医学部付属動物実験施設による)。

V. グルコース、アルギニン、尿素の分解試験

被検菌を 10% (V/V) ウマ血清添加ハートインフュージョンブロス (Heart infusion broth) (Difco社製) で、24 時間培養し、その 1 ml をそれぞれグルコース、アルギニン、尿素を含む被検培地および対照培地に接種した。培養試験管を密栓して、37℃ で 1 週間培養した。被検物質を含まない対照と 0.5 以上の pH の下降または上昇のみら

れたものを陽性として、判定した結果は以下の通りであった。

グルコース分解活性: 陰性、

アルギニン分解活性: 陽性、

尿素分解活性: 陰性、

以上の結果から、細胞壁の完全欠如、直径 0.1 ~ 0.2 μm の基本小体を有し、集落形態として、寒天培地にくい込んで増殖し、目玉焼状集落を形成する特徴を有し、発育に血清を必要とすることからマイコプラズマ属に属する。そこで、抗体による増殖阻害試験により、本菌株は、マイコプラズマ・オラーレ (TGIF) (Mycoplasma orale (TGIF)、微工研菌条寄第 1970 号 (FERM BP-1970)) と同定命名した。

宿主微生物への目的組換え DNA 移入の有無についての選択は、目的組換え DNA を保持するベクターの薬剤耐性マーカーとアルギニン・デヒミナーゼとを同時に発現し得る微生物を検索すればよく、例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培

地で生育し、且つアルギニン・デヒミナーゼを生成する微生物を選択すればよい。

かくして得た形質転換体を具体的に例示すれば、マイコプラズマ・オラーレ (TGIF) より採取したアルギニン・デヒミナーゼをコードする DNA をプラスミド pUC118 (宝酒造社製) に組み込み、宿主微生物エシェリヒア・コリ DH1 (T. Maniatis, et al. Molecular cloning, Cold Spring Harbor (1982), 504-506) にトランスフォーメーションし遺伝子ライブラリーを作製し、予め合成したプローブによりコロニーハイブリダイゼーションを行い、クローニングを行って得たエシェリヒア・コリ DH1-PUC118-TGIF (Escherichia coli DH1-PUC118-TGIF、微工研菌条寄第 1969 号 (FERM BP-1969)) が挙げられる。

アルギニン・デヒミナーゼをコードする DNA を含むベクターを製造するに当たっては、前述の如く得た遺伝子ライブラリーをプローブによりコロニーハイブリダイゼーションを行い、クローニ

ングを行って得た形質転換体より通常の方法により抽出すればよい。アルギニン・デヒミナーゼをコードするDNAを含むベクターの具体的な例示としては、エシェリヒア・コリDH1-PUC118-TGIFより採取したプラスミド(pcTGIF1と命名)が挙げられる。プラスミドpcTGIF1の制限酵素開裂地図は、第3図に示される通りであった。

アルギニン・デヒミナーゼを製造するに当たっては、宿主微生物と同一のコドンユースを有する微生物をDNAの供与微生物とした場合とそうでない場合とに分け、それぞれに応じて操作を行う必要がある。即ち、もともと同一のコドンユースを有する場合かあるいは供与微生物と同一のコドンユースを有するような変異株を宿主微生物とした場合には、前記に記載の如く、採取したアルギニン・デヒミナーゼのアミノ酸配列をコードするDNAを含む組換えDNAベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカとアルギニン・デヒミナーゼの活性と

を指標としてスクリーニングして取得した該組換えDNAベクターを保持する微生物を培養しアルギニン・デヒミナーゼを採取すればよい。

宿主微生物と同一のコドンユースを有しない微生物をDNAの供与微生物とした場合には、例えば、供与微生物がマイコプラズマ属に属する微生物であり、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)を宿主微生物とするような場合には、マイコプラズマ属においてトリプトファンをコードするコドンTGAが通常のエシェリヒア・コリにおいては終止コドンであるので、TGAをトリプトファンとして認識する様にナンセンスサプレッションのかかった変異株エシェリヒア・コリCAJ64(*Escherichia coli* CAJ64)(京都大学理学部生物物理学科 小関治男教授より分与を受けた)等を使用してアルギニン・デヒミナーゼの発現を行えばよい。具体的には、エシェリヒア・コリCAJ64株をプラスミドpcTGIF1で形質転換して得たエシェリヒア・コリCAJ64-PUC118-TGIFを培養してアルギニン・デヒミ

ナーゼの発現を行えばよい。

また、例えば、供与微生物がマイコプラズマ属に属する微生物であり、通常のエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)を宿主微生物とするような場合には、予めマイコプラズマ属等の供与微生物から採取したDNAまたは組換えDNAベクター中のコドンTGAを例えばトリプトファンをコードするTGGとするポイントミューテーションを行った後、得られた変換DNAを含むベクターにて再度のエシェリヒア・コリを形質転換し、アルギニン・デヒミナーゼの製造をせしめてもよい。

TGAをTGGとなすポイントミューテーションとしては以下の方法が例示される。

前述のエシェリヒア・コリDH1-PUC118-TGIFに、M13K07ファージを感染させ、pcTGIFの一本鎖環状DNAを得る。次いで、この一本鎖環状DNAに相補的で、かつTGAコドンのうちの一つの相補配列を含むオリゴヌクレオチドを設計し、そのTGAに相補的な部分の3'ACT5'のTをCに換えたものを作製する。続いて、一

本鎖環状DNAに、オリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、これをプライマーとしてDNA合成を行い、一本鎖環状DNAを二本鎖環状DNAとし、エシェリヒア・コリヘトランスフォーメーションする。先のオリゴヌクレオチドを放射能ラベルし、プローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行い、ポジティブ株を目的の変異DNA形質転換体として選択する。同様な操作を順次繰り返すことにより全てのTGAコドンをTGGとなすことができる。

このようにして一度選択されたアルギニン・デヒミナーゼ遺伝子を保有する組換えDNAは、形質転換体から取り出され、他の宿主微生物に移入することも容易に実施できる。また、アルギニン・デヒミナーゼ遺伝子を保持する組換えDNAから制限酵素などにより切断してアルギニン・デヒミナーゼ遺伝子であるDNAを切り出し、これと同様な方法により切断して得られる他のベクター断片とを結合させて、他の宿主微生物に移入することも容易に実施できる。

かくして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地に培養されることにより多量のアルギニン・デイミナーゼを安定して産生し得る。

形質転換体である微生物の培養形態はその栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すれば良く、通常多くの場合は、液体培養で行うか、工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては、資化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

培養温度は微生物が発育し、アルギニン・デイ

ミナーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリの場合、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は、条件によって多少異なるが、アルギニン・デイミナーゼが最高収量に達する時期を見計らって適当な時期に培養を終了すればよく、通常は12～48時間程度である。培地pHは菌が発育し、アルギニン・デイミナーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0～8.0程度である。

培養物中のアルギニン・デイミナーゼは、菌体を含む培養液そのままを採取し、利用することもできるが、一般には常法に従って、アルギニン・デイミナーゼが培養液中に存在する場合には、濾過、遠心分離などによりアルギニン・デイミナーゼ含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。アルギニン・デイミナーゼが菌体内に存在する場合には、得られた培養物を濾過または遠心分離などの手段により、菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的な方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等の

キレート剤および/または界面活性剤を添加してアルギニン・デイミナーゼを可溶化し水溶液として分離採取する。

この様にして得られたアルギニン・デイミナーゼ含有溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更には親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。次いでこの沈澱物を、水に溶解し、半透膜にて透析せしめて、より低分子量の不純物を除去することができる。また吸着剤あるいはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、これらの手段を用いて得られるアルギニン・デイミナーゼ含有溶液は、減圧濃縮凍結乾燥等の処理にてより精製されたアルギニン・デイミナーゼを得ることができる。

以上の製造法により得られるアルギニン・デイミナーゼとして例えば下記の諸物性を有する新規なアルギニン・デイミナーゼが例示される。

(I) アルギニン・デイミナーゼ活性測定法

基質溶液の調整：

200mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.2) 200μlに50mM DTT (ディチオスレイトール) 80μl, 100mMアルギニン・塩酸付加物40μlを溶解して、基質溶液を調整する。

酵素溶液の調整：

後述の実施例により得られた本発明アルギニン・デイミナーゼ溶液を10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)でOD₂₈₀ = 0.005になるように希釈して酵素溶液とした。

活性測定：

前記の基質溶液320μlを小試験管に取り、37℃、水浴中に2分間静置した後、酵素溶液80μl添加し、反応を開始する。正確に3分間、37℃で反応した後、5M過塩素酸100μlを添加し反応を停止する。その後、反応液に、酸化還元緩衝液(9.0g NH₄Fe(SO₄)₂ · 12H₂O, 11.0g (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ · 6H₂Oを1N硫酸溶液に溶解し100mlとした溶液) 125μlを加え、その後

酸混合液 (蒸留水 200 ml, H_2PO_4 (d=1.74) 300 ml, H_2PO_4 (d=1.84) 100 ml) 625 μ l を加え、ジアセチルモノキシム溶液 (ジアセチルモノキシム 0.75g を蒸留水に溶解し 100 ml とした溶液) 250 μ l を加え、遮光下、20 分間沸騰水中で加熱し、その後冷却し、490 nm の吸光度を測定する。シトルリン生成量を算定するための標準線は、1 M 過塩素酸で調整した種々の濃度 (0.01~0.05 μ mole/ml) の L-シトルリン溶液 500 μ l を用い、上記酸化還元緩衝液 125 μ l 添加以降の操作を行ってシトルリン濃度に対する 490nm の吸光度の関係をプロットして作成し、直線領域を標準検量線として使用した。

(2) 基質特異性:

遊離アミノ酸に対する反応の特異性を調べるために、アミノ酸混合液 (1 l の 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) に L-アラギニン 200mg, L-アスパラギン・ H_2O 56.8mg, L-アスパラギン酸 20mg, L-スチン 50mg, L-グルタミン酸 20mg, L-グルタミン 300mg, グリシン 10mg, L-ヒスチジン 15mg, L-ヒロキソリン 20mg, L-イソロイシン 50mg, L-ロイシン 50mg, L-リジン

HC 40mg, L-メチオニン 15mg, L-フェニルアラニン 15mg, L-プロリン 20mg, L-セリン 30mg, L-スレオニン 20mg, L-チロシン 20mg, L-バリン 20mg, L-トリプトファン 5mg を含有する) 800 μ l に 200 μ l の本発明アルギニン・デイミナーゼ溶液 ($OD_{550nm} = 0.016$) を添加し、37℃、18 時間インキュベートした後、アミノ酸濃度の変化をアミノ酸自動分析装置 (日立 L-8500 型) を用いて解析した。対照として、本発明アルギニン・デイミナーゼ溶液の代わりに 10mM トリス塩酸緩衝液を添加して同じ操作を行った。その結果第 1 表に示す如く本発明アルギニン・デイミナーゼは、L-アルギニンに特異的に作用してシトルリンを生成する反応を触媒する酵素であることがわかった。

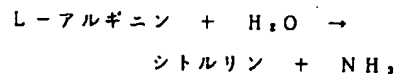
第 1 表

アミノ酸	本発明酵素添加	対照
L-アスパラギン酸	17.25	17.59
L-ヒロキソリン	13.39	13.23
L-スレオニン	17.09	17.38
L-セリン	24.73	25.18

L-アスパラギン	43.41	44.42
L-グルタミン酸	16.18	16.58
L-グルタミン	202.88	208.44
L-プロリン	16.53	17.11
グリシン	8.38	8.58
L-シトルリン	153.01	-----
L-バリン	16.59	16.63
L-スチン	34.55	35.06
L-メチオニン	11.09	11.47
L-イソロイシン	41.58	42.16
L-ロイシン	42.22	42.96
L-チロシン	17.01	17.19
L-フェニルアラニン	12.60	12.78
L-トリプトファン	3.36	2.39
L-リジン	25.84	26.19
L-ヒスチジン	10.18	11.22
L-アラギニン	-----	152.06

(3) 酵素作用:

次の反応を触媒する。



(4) pH 安定性:

10 μ l の本発明酵素溶液 ($OD_{550nm} = 0.8$) を 40 μ l の試験 pH 緩衝液と混合し、37℃、3 時間インキュベートした後、950 μ l の PBS を加えて、20 倍に希釈し、残存する酵素活性を前記酵素活性測定法に従って計測した。その結果、pH 5.0~10.0 まで安定であった。尚、試験 pH 緩衝液は、pH 3.0~6.0 までは 0.1 M クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0~9.0 までは 0.1 M トリス塩酸緩衝液、pH 10.0 は 0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液を用いた。

(5) 至適 pH:

種々の pH 値の緩衝液を用いて、前述の酵素活性測定法に従い、測定した結果、pH 7.0~7.5 の範囲に至適 pH を有していた。

分子量:

47000 \pm 5000 (SDS-PAGE 法)

55000 \pm 5000 (ゲル濾過法)

(7) 等電点:

アンフォライン ビーエープレート (AMPHOLINE PAGPLATE; LKB社製) を用いる等電点電気泳動法により測定した結果、 pI 7.4 \pm 0.5 に等電点を有する。

(8) N末端アミノ酸配列解析

後述の実施例に基づいて得られた本発明酵素 (総OD_{280nm} = 0.01) を用いて液相プロテインシーケンサー (ベックマン社製: BECKMAN System 890ME) によりN末端側からのアミノ酸配列を解析した結果、まず、以下の如く5番目までの配列が明らかとなり、

X-Ser-Val-Phe-Ser-Asp-
(式中、Xは水素原子又はMetを示す)

更に、総OD_{280nm} = 0.05のサンプルで解析の結果、以下の如く30番目までの配列が明らかとなった。

X-Ser-Val-Phe-Ser-
Asp-Lys-Phe-Asn-Gly-

レヒシン	23.1
レグルタミン酸	37.4
レプロリン	22.6
グリシン	27.1
レアラニン	23.1
レバリン	37.1
1/2 レシスチン	1.9
レメチニン	3.8
レイソロイシン	25.3
レロイシン	48.4
レチロシン	16.7
レフェニルアラニン	18.8
レリジン	46.8
レヒスチジン	7.8
レアラギニン	14.0

以上の諸性質を公知のアルギニン・デイミナーゼと比較すると、いずれの酵素とも異なることが判る。

また、本発明酵素は腫瘍細胞にたいする強い増殖阻害活性を示すことから抗癌剤としての用途が

Ile-His-Val-Tyr-Ser-
Glu-Ile-Gly-Asp-Leu-
Glu-Ser-Val-Leu-Val-
His-Glu-Pro-Gly-Lys-
Glu-

(式中、Xは水素原子又はMetを示す)

(9) アミノ酸組成分析

精製した本発明酵素標品 (OD_{280nm} = 0.08) 1mlに12N塩酸を等量加え、105℃、24時間加水分解した後、アミノ酸自動分析装置 (日立L-8500型) を用いて解析した。本発明酵素の分子量はSDS電気泳動から約47000であり、アミノ酸の平均分子量を110とすると構成アミノ酸は約427残基となることから、分析結果を427残基当たりのアミノ酸残基数で表し、その結果を第2表に示す。

第2表

アミノ酸	427残基としたときの残基数
レアラニン	49.4
レアラニン	24.9

考えられる。以下に本発明酵素の腫瘍細胞に対する理化学的諸性状を示す。

(a) 細胞増殖抑制活性の測定法

測定に用いる細胞: 本発明酵素に対し阻害感受性の高い細胞としてCCRF-CEM細胞 (ヒトリンパ球系白血病細胞; 大日本製薬株式会社より購入) を選定し、検定に使用した。

培養用培地: 10%牛胎児血清 (FCS) 添加 RPMI-1640培地 (100mg/lのペニシリンG及び硫酸ジヒドロストレプトマイシンを含む)。

測定方法: 上記培養用培地で培養された対数増殖期にあるCCRF-CEM細胞を集め、新鮮な培養用培地に懸濁し、細胞濃度を 1.11×10^4 個/mlに調整する。その後、得られた細胞含有溶液を24穴マルチプレート (MULTIDISH; NUNC社製) に900 μ l/穴 (well) ずつ均質な細胞懸濁液を播種する。フィルター (MILLEX GV フィルター; ミリポア社製) で濾過滅菌した試験溶液を100 μ l/well添加し、ゆるく攪拌する。コントロールとしてPBS (リン酸緩衝液生理食

塩水) 100 μ l/well添加する。細胞懸濁液を播種した24穴マルチプレートそれぞれを、5% CO₂、95%空気、100%湿度、37℃のインキュベーターで4日間培養した後、各well内の細胞数をコールターカウンター(米国:コールター社製)を用いて計測する。

以下の式に従い増殖抑制率(%)を算出する。

$$\text{増殖抑制率}(\%) = 1 - \frac{A - B}{C - B} \times 100$$

A: 試験液細胞数

B: 播種細胞数

C: コントロール溶液の細胞数

この系で、CCRF-CEM細胞の増殖を50%阻害する活性を1単位(u)とした。

(b)細胞増殖抑制に対するpH安定性

10 μ lの本発明酵素溶液(10000 u/ml)を40 μ lの試験pH緩衝液と混合し、37℃、3時間インキュベートした後、950 μ lのPBSを加えて、20倍に希釈し、残存する細胞増殖抑制活性を前記細胞増殖抑制活性の測定法に示した方法に従って計測した。その結果、pH 5

各種の酵素を用い、それぞれの至適pHで37℃、6時間反応した後、残存する細胞増殖抑制活性を測定することにより評価した。以下にその結果を第4表に示す。

第4表

酵素	pH	残存活性(%)
トリプシン	7.0	10
プロテアーゼ K	7.0	77
パナセリン プロテアーゼ	7.0	53
D N a s e I	7.0	100
R N a s e A	7.0	100
ノイミニダーゼ	6.0	100
エンドグリコリダーゼ	6.0	100

(c)細胞増殖抑制作用の各種の有機酸および有機溶媒に対する安定性

本発明酵素溶液(2000 u/ml)に各種の有機酸および有機溶媒を各添加濃度(V/V%)で添加し、25℃、1時間反応した。その後反応液をPBSを用いて希釈し、本発明酵素濃度を1

0~10.0まで安定であった。

尚、試験pH緩衝液は、pH 3.0~6.0までは0.1Mクエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0~9.0までは0.1Mトリス塩酸緩衝液、pH 10.0は0.1Mグリシン-NaOH緩衝液を用いた。

(c)細胞増殖抑制に対する熱安定性

10 μ lの本発明酵素溶液(10000 u/ml)を990 μ lの0.05Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.0)に加え、37℃で24時間、60℃で1時間、100℃で5分間処理した後氷冷し、残存する細胞増殖抑制活性を測定することにより評価した。以下の第3表にその結果を示す。

第3表

条件	残存活性(%)
37℃で24時間	100
60℃で1時間	0
100℃で5分間	0

(d)細胞増殖抑制作用の各種酵素に対する安定性

00 u/mlになる様に調整した後、残存する細胞増殖抑制活性を測定することにより評価した。以下にその結果を第5表に示す。

第5表

有機酸又は有機溶媒	濃度	残存活性(%)
ギ酸	0.1	3
酢酸	0.1	96
トリフルオロ酢酸	0.1	0
メタノール	50.0	0
エタノール	50.0	0
イソプロパノール	50.0	0
アセトン	50.0	0
N,N-ジメチルフォルムアミド	50.0	5
ジメチルスルホキシド	50.0	99
アセトニトリル	50.0	0

(f)各種腫瘍細胞に対する増殖抑制作用

各種培養系の腫瘍細胞に対する本発明酵素の増殖抑制作用について、ヒトリンパ球系白血病由来細胞株(CCRF-CEM, CCRF-HSB2,

CCRF-SB, RPMI-8226), ヒト骨髓系白血病由来細胞株 (K-562, HEL92・1・7), ヒト腎癌由来細胞株 (TRC-29R), ヒト肺癌由来細胞株 (TLC-7NC3), マウス乳癌由来細胞株 (C-1271) を用い、これらの細胞株の増殖に及ぼす影響を調べた。培養に用いた培地は、C-1271細胞株には、E-MEM培地に10%牛胎児血清を添加した培地を使用し、それ以外の細胞株は、RPMI-1640培地に10%牛胎児血清を添加した培地を使用した。それぞれの細胞株を各培地で培養し、対数増殖期にあるこれらの腫瘍細胞株を集め、新鮮な培養用培地に懸濁し、細胞濃度を 1×10^4 個/mlになる様に調整した。24穴マルチプレートに均一に懸濁した細胞浮遊液を1ml/wellに播種した後、PBSに溶解した本発明酵素の種々の濃度の希釈液 $100 \mu\text{l}$ /well添加し、5%CO₂, 95%空気, 100%湿度, 37℃のインキュベーターで4日間培養した。対照として本発明酵素の希釈液の代わりにPBSを添加して培養した。

培養後の細胞数の測定は、浮遊系の細胞 (白血病由来細胞) は、ISOTON II® (米国; コールター社製) で20倍に希釈し、付着性細胞は、培地を吸引除去した後0.1%トリプシン溶液1mlで、培養基質から細胞を剥離し、ISOTON II®で20倍に希釈して測定用サンプルとし、コールターカウンター (米国; コールター社製) を用いて計測した。更に以下の式に従い増殖抑制率 (%) を算出する。

$$\text{増殖抑制率}(\%) = 1 - \frac{A - B}{C - B} \times 100$$

A ; 試験液細胞数

B ; 播種細胞数

C ; 対照溶液の細胞数

その結果、試験に供したすべての腫瘍細胞株で増殖抑制作用が認められ、50%の増殖阻害をしめす本発明酵素濃度は第6表に示す如く、280nmに於けるOD値が 10^{-3} ~ 10^{-4} の領域にあり、極めて微量で作用することが明らかとなった。

第6表

腫瘍細胞株	50% 増殖阻害濃度(OD _{280nm})
CCRF-CEM	2.3×10^{-3}
CCRF-HSB2	2.4×10^{-3}
CCRF-SB	2.5×10^{-3}
RPMI-8226	1.8×10^{-3}
K-562	5.6×10^{-4}
HEL92・1・7	1.2×10^{-3}
TRC-29R	1.0×10^{-3}
TLC-7NC3	4.4×10^{-3}
C-1271	3.6×10^{-3}

(5) 一般正常細胞に対する本発明酵素の影響

マウス3T3細胞は長期分裂増殖可能であるが、造腫瘍能を有さないことから、正常細胞に近い細胞として、細胞変異及び細胞毒性の研究に広く用いられており、今回一般正常細胞に対する本発明酵素の影響の指標として用いた。マウス3T3細胞を10%牛胎児血清を含むイーグルMEM培地に懸濁し、 5×10^4 個/mlになるように調整し、 $\phi 35\text{mm}$ の組織培養用プラスチックディッシュ

に2mlずつ播種した。更にPBSに溶解したOD_{280nm}値 4.7×10^{-3} の本発明酵素溶液を終濃度がOD_{280nm}値 2.35×10^{-4} (10.2u/ml)になるように添加し、5%CO₂, 95%空気, 100%湿度, 37℃のインキュベーターで培養した。対照として本発明酵素溶液の代わりにPBSを添加して培養した。2日間及び4日間培養した後、0.1%トリプシン溶液を用いて細胞を剥離し、再度培養用培地に懸濁させて単細胞浮遊液とした。細胞浮遊液1容にPBSに溶解した0.1%トリパンブルー溶液9容を加えた後、ノイバウエル氏血球計測盤を用いて細胞数を計測した。トリパンブルーにより青色に染まる細胞は死細胞、染まらない細胞は生細胞であるので、その数を計測した結果、第7表に示す如く、本発明酵素添加培養と無添加培養の場合に於いて、細胞生存率に有意な差は認められず、本発明酵素が、正常細胞に対して直接的な毒性を有さないことを示した。

第7表

培養日数	酵素添加	細胞生存率
2日間	有り	91%
	無し	88%
4日間	有り	92%
	無し	90%

また本質的にアルギニン・デヒミナーゼ活性のあるアルギニン・デヒミナーゼムテインのDNAは、本発明のアルギニン・デヒミナーゼ遺伝子から遺伝子工学的的手法により作製される人工変異遺伝子を意味し、この人工変異遺伝子は上述の種々なる遺伝子工学的的方法を使用して得られ、特に優れた性質を有するアルギニン・デヒミナーゼムテインDNAは、最終的には、このムテインDNAをベクターに挿入せしめて組換えDNAを作成し、これを宿主微生物に移入させることによって、アルギニン・デヒミナーゼムテインの製造が可能である。

本明細書に記載のアミノ酸、ペプチド、核酸、核酸関連物質、その他に関する略号は、それらの

当該分野における慣用略号に基づくもので、それらの例を以下に列記する。またすべてのアミノ酸はL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸
 RNA : リボ核酸
 A : アデニン
 T : チミン
 G : グアニン
 C : シトシン
 Ala : アラニン
 Arg : アルギニン
 Asn : アスパラギン
 Asp : アスパラギン酸
 Cys : システイン
 Gln : グルタミン
 Glu : グルタミン酸
 Gly : グリシン
 His : ヒスチジン
 Ile : イソロイシン
 Leu : ロイシン

Lys : リジン
 Met : メチオニン
 Phe : フェニルアラニン
 Pro : プロリン
 Ser : セリン
 Thr : スレオニン
 Trp : トリプトファン
 Tyr : チロシン
 Val : バリン

(実施例)

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

実施例

1) マイコプラズマからのDNAの抽出

PPL0ブロス(DIFCO社製)7容、ウマ血清2容、酵母エキス1容、ペニシリンG1000u/ml、酢酸カリウム500μg/mlを加えた液体培地1ℓに、 1×10^8 CFU/mlのマイコプラズマ・オラーレ(TGIF)を10

ml接種し、37℃、5日間静置培養した。培養液を高速冷却遠心分離機(日立SCR-20BA型)を用い、14,000rpm(25,000G)で15分間遠心分離し、2.8gのマイコプラズマ菌体を得た。マイコプラズマからのDNAの抽出は、J.Marmurの方法(J.Mol.Biol.(1961)3,208-218)により行った。即ち、マイコプラズマ菌体を50mlの0.1M EDTA含有生理食塩水に懸濁し、先と同じ条件で菌体を遠心分離した後、再度25mlの0.1M EDTA含有生理食塩水に懸濁した。これに20%SDSを加え、60℃で10分間処理し、細胞を破壊した後、最終濃度が1Mになるように過塩素酸ナトリウムを加え蛋白を変性せしめ、等量のクロロホルム:イソアミルアルコール=24:1混合液を加え30分間穏やかに振盪した後、10,000rpm(13,000G)で10分間遠心し、分離した水層を他の容器に移し、2倍量のエタノールを加え析出してくる染色体をガラス棒にからめて取得した。

この染色体を生理食塩含有クエン酸緩衝液 (pH 7.0) 10 ml に溶解し、再度クロロホルムにて処理し、2.5 倍量のエタノールを加え、3,000 rpm (2,000 G) で15分間遠心した。沈澱した染色体を75%エタノールで洗い、乾燥後、再び生理食塩含有クエン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 ml に溶解し、最終濃度 50 µg/ml の RNase A (シグマ社製) を加え、37℃、30分間 RNA を分解した。次いでこれを再度クロロホルムにて処理しエタノール沈澱した後、染色体を 0.1 mM EDTA 含有 0.3 M 酢酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。これに 0.54 倍量のイソプロパノールを加え、析出してきた染色体を再びガラス棒にからめて取得した。

この染色体を再び 0.3 M 酢酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、0.54 倍量のイソプロパノールを加え 3,000 rpm (2,000 G) で15分間遠心し、沈澱した染色体を75%エタノールで洗い、乾燥せしめ、染色体標品 179 µg を得た。

末端のリン酸基を除去した。

以上の操作を行った pUC118 100 ng、マイコプラズマ染色体 200 ng を T4 DNA ライゲース (宝酒造社製) 100 u で、66 mM Tris-HCl (pH 7.6)、6.6 mM MgCl₂、10 mM DTT、660 µM ATP (ベーリンガー・マンハイム社製) 存在下 16℃、16時間ライゲーションした。これを K. Shigesada の方法 (細胞工学 (1983) 2, 616-626) によってコンピテント細胞とした E. coli DH1 (F⁻, recA1, e⁻, nal, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r⁻, m⁻), supE44, rel1, λ⁻) (T. Maniatis, et al. Molecular cloning, Cold Spring Harbor (1982), 504-506) にトランスフォーメーションし、50 µg/ml アンピシリン含有 L 平板寒天培地 (バクトトリブトン (DIFCO 社製) 20 g/l、酵母エキス (DIFCO 社製) 5 g/l、NaCl 5 g/l、バクタガー (DIFCO 社製) 15 g/l) にて一夜培養し約 30,000 のアンピシリン耐性コロニーを得、マイコプラズマ遺伝子ライブラリーと

2) マイコプラズマ遺伝子ライブラリーの作成

マイコプラズマ染色体 2 µg を制限エンドスクレアーゼ Sau3A1 (東洋紡績社製) 6 u で 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM NaCl、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、10 µg/ml BSA (ベーリンガー・マンハイム社製) 存在下 37℃、2時間切断処理した。また、ベクタープラスミド pUC118 (Col E1 ori, Amp^r, M13IG; 宝酒造社製) 2 µg を制限エンドスクレアーゼ BamHI (東洋紡績社製) 6 u で 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、10 µg/ml BSA (ベーリンガー・マンハイム社製) 存在下、37℃、16時間切断処理した後、フェノール処理、フェノール・クロロフォルム処理を行い、エタノール沈澱した。この直鎖状になった pUC118 を大腸菌由来アルカリフォスファターゼ (東洋紡績社製) で、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM MgCl₂ 存在下、65℃、1時間反応させ、5'

した。

3) 放射性オリゴヌクレオチドプローブの作製

判明しているアルギニン・デヒミナーゼの N 末端側の 30 アミノ酸配列を基に、その遺伝子の 5' 末端側から 90 塩基配列を予想した。この予想配列の中から 17 塩基配列 2ヶ所を選び、その配列を持つオリゴヌクレオチド 2 種を設計した。この際予想される塩基配列は複数であり、それに対応するオリゴヌクレオチドも複数の配列のものの混合物とした。

このオリゴヌクレオチドをアール・エル・レッシンジャーらの方法 (R.L. Letsinger, W.B. Lursford Journal Am. Chem. Society 98, 3655) に基づき DNA シンセサイザー (ベックマン社製: Beckman System1 plus) を用いて作製した。

完成したオリゴヌクレオチド 200 ng を T4 ポリヌクレオチドキナーゼバッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM MgCl₂、10 mM 2-メルカプトエタノール) および、20 µCi の γ³²P-ATP (アマシ

ラムジャパン社製) 存在下、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡績社製) 8.5 uで37℃、30分間反応せしめ、アイソトープ³²Pを取り込ませ放射性オリゴヌクレオチドプローブとした。

4) アルギニン・デイミナーゼ遺伝子含有クロロンのスクリーニング

前述の如くにより得た遺伝子ライブラリー即ち平板寒天培地上のアンピシリン耐性コロニー上にナイロンメンブレンフィルター(PALL社製: バイオダインA)を重ね、フィルター上に該コロニー菌体の一部を移行させた。さらに、同じ平板寒天培地より同一の操作で該コロニー菌体の一部を移行させたもう一枚のフィルターを作成し、以後の操作を並行して行った。該コロニー菌体の一部を移行させたフィルターを別の50 µg/mlアンピシリン含有寒天平板培地上に重ね、フィルター上の菌体を37℃で16時間培養した。培養後、このフィルターをアルカリ変性溶液(0.5 N NaOH、1.5 N NaCl)に5分間浸し、さらに3 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5

5) に5分間浸した後乾燥した。このフィルターを80℃で1時間加熱し、菌体中にあったプラスミドDNAをフィルターに固定した。

さらにこのフィルターをプレハイブリダイゼーション溶液(NaCl 52.6 g/l、クエン酸三ナトリウム 26.5 g/l、ピロリン酸ナトリウム 0.5 g/l、ドデシル硫酸ナトリウム 1 g/l、フィコール(ファルマシア社製) 1 g/l、ポリビニルピロリドン 1 g/l、B SA(ベーリンガー・マンハイム社製) 1 g/l、サケ精子DNA(ファルマシア社製) 100 mg/l)に浸し、37℃で16時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターをハイブリダイゼーション溶液(上記プレハイブリダイゼーション溶液の組成中より、ドデシル硫酸ナトリウムおよびサケ精子DNAを除き、tRNA(ベーリンガー・マンハイム社製) 20 mg/lを加えたもの)に浸し、先に用意した放射性オリゴヌクレオチドプローブ2種を、二枚のフィルターにそれぞれ1種ずつ加え、35~40℃で2

4時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、洗浄液(NaCl 52.6 g/l、クエン酸三ナトリウム 26.5 g/l、ピロリン酸ナトリウム 0.5 g/l)でフィルターを3回洗浄し、次いでこのフィルターを38~42℃の洗浄液に10分間浸し、余分なプローブを洗い落とし、フィルターは風乾後X線フィルム(富士写真フィルム社製: New RXO-H)を重ね、遮光下、-70℃で24時間オートラジオグラフィーを行った。

オートラジオグラフィー終了後、フィルムを現像し、2種のプローブの両方にポジティブシグナルが観察されたコロニーを確認した。該コロニーを、アルギニン・デイミナーゼをコードするDNAを含む形質転換体(エシェリヒア・コリDH1-PUC118-TGIF)として取得した。

5) 組換えプラスミドの抽出

エシェリヒア・コリDH1-PUC118-TGIFよりテイ・マニアティスらの方法(T. Maniatis, et al. Molecular cloning. Cold Spring Har

bor(1982), 86-94)によって、アルギニン・デイミナーゼをコードするDNAを含む組換えプラスミドpcTGIF1を抽出した。このプラスミド中のマイコプラズマ染色体由来の部位をジデオキシ法(Science 214: 1205~1210 (1981年))により塩基配列を決定し、アルギニン・デイミナーゼをコードする全DNAが含まれていることを確認すると共にその全塩基配列を決定した。EcoRI, HindIII, Sau3AIを用いてこのプラスミドの制限酵素開裂地図を作成し、その結果を第3図に示す。

6) トランスフェクション

E. coli CAJ64株を2×YT培地(1.6% Bacto Trypton(DIFCO社製) 1.0% Yeast Extract(DIFCO社製) 0.5% NaCl)を用いて37℃で培養し、OD_{550nm} = 0.5に達したときの菌体を使用した。

集菌した菌体を10 mlの50 mM CaCl₂に懸濁し、0℃で20分間静置した後集菌し、再度2 mlの50 mM CaCl₂に懸濁し、0℃で30分間静置した。この懸濁液100 µlにプラスミドpcTGIF1溶液1 µl(1 ng/µl)を

添加し0℃で30分間静置した後、42℃90秒間、0℃90秒間のヒートショックを加え、続いて900μℓのL培地(2.0% Bacto Trypton(DIFCO社製) 0.5% Yeast Extract(DIFCO社製) 0.5% NaCl)を添加して37℃50分間インキュベートした。インキュベート後、菌体を50μg/μℓアンピシリン含有L寒天平板培地(L培地+1.5% Bacto Agar(DIFCO社製))上に播種し、37℃で1晩培養しコロニーを形成した菌株をエシェリヒア・コリCAJ64-PUC118-TGIFとして得た。

7) 培養と細胞抽出物の調製

pcTGIF1で形質転換した菌株を50μg/μℓアンピシリン含有L培地(1.0% Bacto Trypton(DIFCO社製) 0.5% Yeast Extract(DIFCO社製) 1.0% NaCl)15mℓ中で37℃、18時間培養した後、遠心分離(6000rpm、10分間)により集菌し300μℓのTE(10mM Tris-HCl(DIFCO社製), 1mM EDTA, pH7.4)に懸濁した。

超音波破砕機を用いて菌体を破砕した後、1400

Orpm、5分間遠心分離し、上清を取得して細胞抽出物とした。

8) 細胞抽出物のアルギニン・デイミナーゼ活性の確認

pcTGIF1で形質転換したE.coli CAJ64でのTGIF1遺伝子の発現を確認するために、形質転換後の細胞抽出物中のアルギニン・デイミナーゼ活性を測定した。

細胞抽出物160μℓに200mMトリス緩衝液(pH7.2)を400μℓ、50mM DTT(ジチオスチートール)を160μℓ、100mM L-アルギニン溶液を80μℓ添加した後ポアサイズ0.22μmのメンブランフィルター(Amicon社製)で濾過滅菌し、無菌的に37℃で18時間インキュベートした。インキュベート後の反応液400μℓに5M過塩素酸100μℓを添加して反応を停止させ、次いで酸還緩衝液(1N H₂SO₄ 100ml中にNH₄Fe(SO₄)₂・12H₂Oを9.0gおよび(NH₄)₂Fe(SO₄)₂・6H₂Oを11.0gを含む)125μℓ、酸混合液(H₂O 200ml, H₃PO₄(d=1.74)300m

l, H₂SO₄(d=1.84)100mlの混合液)、ジアセチルモノオキシム溶液(0.75g/100ml H₂O)250μℓを順次添加した後、遮光して沸騰水上で20分間加熱した。冷水で温度を室温に戻した後490nmの吸光度を測定し、標準検量線からシトルリンの生成量を算定した。

形質転換していないE.coli CAJ64の抽出物について、上記と同じ操作を行い対照とした。

表8に示した結果から明らかな様に、pcTGIF1プラスミドの移入により、アルギニン・デイミナーゼ活性の発現が確認された。

表 8

細胞抽出物	シトルリン生成量 (nmole/18hr)
形質転換体	52.1
非転換体	3.7

「発明の効果」

本発明のアルギニン・デイミナーゼをコードするDNAおよび該DNAを保持する形質転換体は、該形質転換体を培養することを特徴とする該酵素の製造法に用いられるものであり、腫瘍細胞増

殖阻害剤として有用である該酵素を大量に提供することが可能となった。

「図面の簡単な説明」

第1図は、アルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列を示す。第2図は、アルギニン・デイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを示す。第3図は、プラスミドpcTGIF1の制限酵素開裂地図である。

特許出願人 工業技術院院長

TCTGTATTAGCCAGCAAAATTTAATGGAATTCATGTTTACTCAGAAATTTGGTGATTTGGAA 60
 TCAGTTTTAGTACATGAACAGGAAAGAAATTTGATTTACATTAACCCACGCTCGTTTTAGAT 120
 GAGCTTCTATTCTCAGCTATTCTTGAAGCACTGATGCTAGAAAAAGAACACAAAGAATTC 180
 GTAGAAATTCCTAAAAACACAGGAATTAATGTTGTTGAATTAAGTTGACTTAGTACTGAA 240
 ACATACAACTTAGTAGACAAAAAAACACAGAAAAATTAAGTAAAGATTTCTTAGATGAC 300
 TCAGAAGCTGTTCTTTCACCTGAACACAGAAAAAGCTGTAGAAAAATTTCTTAAATCTTTA 360
 AAATCAACAAAGAAATTAATCCAATACATGATGCCAGGTATTACTAAATATGATTTAGGA 420
 ATTAAGCAGATAAAGCAATTAATAGTTGACCCCAATGCCTAACTTATACTTTACTCGTGAC 480
 CCATTTGCATCAAGTTGGTAAATGTTTACAATTCACATACATGCGTTACAAAGTTAGACAA 540
 CGTGAACCTTATTTAGCAAAATTCATTTTACAAATCACCCCTAAATTAGTAAAACTCCA 600
 ***TACTATGACCCCAATGAATTTGTCAATTGGAAGGTGCGTACGTATTTATTTACAA 660
 AATGATACATTAGTGTGTTTCAGAAAGAACTGACCTAGAAACTATTACTTTTATTA 720
 GCTAAAAATATTAAAGCAAAATAAGAAATGTGAATTCAAAGCTATAGTTGCAATTAATGTT 780
 CCTAAA***ACAAACTTAATGCACCTAGACACA***CTTACAATGTTAGACAAAGATAAA 840
 TTCTTTACTCACCTATTGCAAAATGATGTATTTAAATTC***GATTACGATTTAGTTAAT 900
 GGTGGAAGCAACCCAGACAGTTGTAAATGGTCTTCTCTTGATATAATTTACTTGAATCA 960
 ATTATCAACAAAAAACCCAGTTTTTAATTCCTATCGCAGGAAAAGGTGCAACCGAATTTGAA 1020
 ACCGCTGTTGAAACACACTTCGATGGTACAAACTACTTAGCAATTAACCCAGGTGTTGTT 1080
 GTAGGATATTACGTAACGTAAAAACAAATGCTGCAATTAGAAGCAAAATGGAATTAAGATT 1140
 CTACCAATTAAGGTAATCAATTTATCTCTGGAATGGAAATGCTGCTGTTGATGTCAATG 1200
 CCTCTTTCACGTAAGATGTTAAAA*** 1260

A-Ser-Val-Phe-Ser-Asp-Lys-Phe-Asn-Gly-Ile-His-Val-Tyr-Ser-Glu-Ile-Gly-Asp-Leu-
 Glu-Ser-Val-Leu-Val-His-Glu-Pro-Gly-Lys-Glu-Ile-Asp-Tyr-Ile-Thr-Pro-Ala-Arg-Leu-
 Asp-Glu-Leu-Leu-Phe-Ser-Ala-Ile-Leu-Glu-Ser-Thr-Asp-Ala-Arg-Lys-Glu-His-Lys-Glu-
 Phe-Val-Glu-Ile-Leu-Lys-Lys-Gln-Gly-Ile-Asn-Val-Val-Glu-Leu-Val-Asp-Leu-Val-Val-
 Glu-Thr-Tyr-Asn-Leu-Val-Asp-Lys-Lys-Thr-Gln-Glu-Lys-Leu-Leu-Lys-Asp-Phe-Leu-Asp-
 Asp-Ser-Glu-Pro-Val-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Arg-Lys-Ala-Val-Glu-Lys-Leu-Lys-Ser-
 Leu-Lys-Ser-Thr-Lys-Glu-Leu-Ile-Gln-Tyr-Met-Met-Ala-Gly-Ile-Thr-Lys-Tyr-Asp-Leu-
 Gly-Ile-Lys-Ala-Asp-Lys-Glu-Leu-Ile-Val-Asp-Pro-Met-Pro-Asn-Leu-Tyr-Phe-Thr-Arg-
 Asp-Pro-Phe-Ala-Ser-Val-Gly-Asn-Gly-Val-Thr-Ile-His-Tyr-Met-Arg-Tyr-Lys-Val-Arg-
 Gln-Arg-Glu-Thr-Leu-Phe-Ser-Lys-Phe-Ile-Phe-Thr-Asn-His-Pro-Lys-Leu-Val-Lys-Thr-
 Pro-Tyr-Tyr-Tyr-Asp-Pro-Ala-Met-Lys-Leu-Ser-Ile-Glu-Gly-Gly-Asp-Val-Phe-Ile-Tyr-
 Asn-Asn-Asp-Thr-Leu-Val-Val-Gly-Val-Ser-Glu-Arg-Thr-Asp-Leu-Glu-Thr-Ile-Thr-Leu-
 Leu-Ala-Lys-Asn-Ile-Lys-Ala-Asn-Lys-Glu-Cys-Glu-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Ala-Ile-Asn-
 Val-Pro-Lys-Trp-Thr-Asn-Leu-Met-His-Leu-Asp-Thr-Trp-Leu-Thr-Met-Leu-Asp-Lys-Asp-
 Lys-Phe-Leu-Tyr-Ser-Pro-Ile-Ala-Asn-Asp-Val-Phe-Lys-Phe-Trp-Asp-Tyr-Asp-Leu-Val-
 Asn-Gly-Gly-Ser-Asn-Pro-Glu-Pro-Val-Val-Asn-Gly-Leu-Pro-Leu-Asp-Lys-Leu-Leu-Glu-
 Ser-Ile-Ile-Asn-Lys-Lys-Pro-Val-Leu-Ile-Pro-Ile-Ala-Gly-Lys-Gly-Ala-Thr-Glu-Ile-
 Glu-Thr-Ala-Val-Glu-Thr-His-Phe-Asp-Gly-Thr-Asn-Tyr-Leu-Ala-Ile-Lys-Pro-Gly-Val-
 Val-Val-Gly-Tyr-Ser-Arg-Asn-Val-Lys-Thr-Asn-Ala-Ala-Leu-Glu-Ala-Asn-Gly-Ile-Lys-
 Val-Leu-Pro-Phe-Lys-Gly-Asn-Gln-Leu-Ser-Leu-Gly-Met-Gly-Asn-Ala-Arg-Cys-Met-Ser-
 Met-Pro-Leu-Ser-Arg-Lys-Asp-Val-Lys-Trp-B

第3図

